

IMMUNOSTIMULATING AGENT

Patent number: JP9208491
Publication date: 1997-08-12
Inventor: YAMAMOTO AKIRA
Applicant: ASAHI OPTICAL CO LTD
Classification:
- **international:** A61K39/385; A61K39/085
- **european:**
Application number: JP19960037113 19960131
Priority number(s):

Also published as:



JP9208491 (A)

Abstract of JP9208491

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain an immunostimulating agent prepared using a support, capable of supporting a super antigen of a factor to activate a T-cell without losing its bioactivity and having no toxicity against a living body.

SOLUTION: This immunostimulating agent is obtained by absorbing a super antigen (e.g. a staphylococcal intestinal toxin) on a calcium phosphate compound (e.g. hydroxyapatite) having Ca/P ratio of 1.0-2.0. The calcium phosphate compound is a particulate material having an average particle diameter of 0.1-10,000 μ m, and the compound is used as it is without drying after the synthesis in a liquid phase or thermally treated at ≤ 700 deg.C before using. The calcium phosphate compound has strong absorption activity on a super antigen, and therefor can absorb the super antigen by bringing the calcium phosphate compound into contact with the super antigen. In this process, the super antigen is dissolved in an isotonic phosphoric acid buffer solution before using. It is preferable that in the immunostimulating agent, an unabsorbed sites is optionally blocked with a blocking agent such as casein. In an immunotherapy of cancer, etc., the immunostimulating agent can enhance its therapeutic effect when used in a drug delivery system capable of effectively bringing the agent to a lesioned part.

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-208491

(43) 公開日 平成9年(1997)8月12日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 39/385	ABD		A 6 1 K 39/385	ABD
39/085			39/085	
// A 6 1 K 47/02			47/02	B

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願平8-37113

(22) 出願日 平成8年(1996)1月31日

(71) 出願人 000000527

旭光学工業株式会社

東京都板橋区前野町2丁目36番9号

(72) 発明者 山本 晃

東京都板橋区前野町2丁目36番9号 旭光
学工業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 三浦 邦夫

(54) 【発明の名称】 免疫賦活剤

(57) 【要約】

【課題】 スーパー抗原を、その生理活性を損なわずに、生体に対して毒性を持たない担体に担持させた免疫賦活剤を提供すること。

【解決手段】 ハイドロキシアパタイトにブドウ球菌腸管毒素を吸着させたことを特徴とする免疫賦活剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 Ca/P 比が1.0～2.0のリン酸カルシウム系化合物にスーパー抗原を吸着させたことを特徴とする免疫賦活剤。

【請求項2】 スーパー抗原がブドウ球菌腸管毒素である請求項1記載の免疫賦活剤。

【請求項3】 リン酸カルシウム系化合物が、液相中で合成した後、乾燥処理を行っていないものである請求項1記載の免疫賦活剤。

【請求項4】 リン酸カルシウム系化合物が、液相中で合成した後、700℃以下の温度で熱処理したものである請求項1記載の免疫賦活剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、T細胞を増殖させる免疫賦活剤に関する。

【0002】

【従来の技術】ブドウ球菌腸管毒素 (Staphylococcal enterotoxin) は、A、B、C、D、Eなど現在7種類程度が知られており、マクロファージなどの抗原提示細胞上のMHCクラスII分子に直接結合し、T細胞レセプターに認識される。MHC II分子とブドウ球菌腸管毒素とT細胞レセプターとの結合は、T細胞レセプターのV β レパートリーに特異的であり、あるスーパー抗原に反応するT細胞は、T細胞全体の10%以上にもなる。このように、特定のV β を持つT細胞と強く反応し、T細胞を増殖させる物質は、ブドウ球菌腸管毒素を含めてスーパー抗原と呼ばれる。

【0003】最近、スーパー抗原の医療あるいは産業への応用が研究され始め、T細胞の活性化という観点から癌の免疫療法への応用などが検討されている。例えば、癌の免疫ターゲッティング療法として、癌抗原を認識する抗体とスーパー抗原を結合させたハイブリッド分子を癌患者に投与することによって抗腫瘍性免疫を誘導しようという試みが紹介されている。しかし、蛋白質分子あるいはペプチド分子などを単独で体内に投与すると、その薬剤が病変部に到達する前に免疫系の働きにより中和されてしまったり、あるいは排除、代謝されてしまい、薬剤の効力が弱められることがある。効果的に薬剤の作用を維持させるために、近年では、薬剤を支持体に担持させて病変部に対して効果的に薬剤を到達させようとする方法、すなわちドラッグデリバリーシステムが考え出されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、T細胞を活性化させる因子であるスーパー抗原を、その生理活性を損なわずに担持することができ、かつ生体に対して毒性を持たない担体を用いた免疫賦活剤を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、担体としてリン酸カルシウム系化合物を用いることによって上記目的を達成したものである。すなわち、本発明による免疫賦活剤は、 Ca/P 比が1.0～2.0のリン酸カルシウム系化合物にスーパー抗原を吸着させたことを特徴とする。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明の免疫賦活剤において、スーパー抗原としては、ブドウ球菌由来の外毒素 (toxic shock syndrome toxin-1; TSS-1と略記される)、ブドウ球菌腸管毒素A～E、レンサ球菌由来の toxic shock-like syndrome (TSLSと略記される)、エルシニア由来のYPMなどが挙げられる。

【0007】本発明の免疫賦活剤において、リン酸カルシウム系化合物としては Ca/P 比が1.0～2.0のものであれば、特に制限はなく、例えば、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ 、 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ 及び $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ のうちから選ばれた1種又は2種以上を使用することができる。これらのうちハイドロキシアパタイトを主成分とするものが最も好ましい。フッ素アパタイトを用いる場合、全リン酸カルシウム系化合物中のフッ素含有率が5重量%以下であるのが好ましい。フッ素含有率が5重量%を超えると、フッ素の溶出が起こり好ましくない。これらのリン酸カルシウム系化合物は、公知の方法で合成することができる。

【0008】また、リン酸カルシウム系化合物は、平均粒径が0.1～10000ミクロンの範囲の粒子であるものが好ましく、0.1～500ミクロンの範囲の粒子がより好ましい。平均粒径が0.1ミクロン未満であると、細胞の食作用により細胞の内部に取り込まれてしまう。平均粒径が10000ミクロンを超えると吸着面積の低減が考えられるので、通常は好ましくない。しかし、粒径は、使用目的、使用形態などによって適宜決定すればよく、血管内に投与する場合には0.1～1ミクロン程度の平均粒径とするのが好ましく、病変部に投与する場合には0.1～100ミクロンの平均粒径とするのが最も好ましい。

【0009】さらに、リン酸カルシウム系化合物の粒子は、液相中で合成した後、乾燥せずにそのまま使用してもよいし、700℃以下の温度で熱処理してから用いてもよい。700℃を超える温度で熱処理したものは、スーパー抗原の吸着量が低下する。

【0010】本発明による免疫賦活剤は、上記のようなリン酸カルシウム系化合物粒子にスーパー抗原を吸着させたものであるが、リン酸カルシウム系化合物は、スーパー抗原に対して強い吸着作用を有するので、これらを接触させることにより吸着を行うことができる。その際、スーパー抗原は、等張リン酸緩衝溶液に溶解させて用いられる。スーパー抗原を吸着したリン酸カルシウム

系化合物粒子は、遠心分離などの方法で分離することができる。さらに、具体的には、リン酸カルシウム系化合物を400mM以上のリン酸ナトリウム緩衝液で予め洗浄し、等張リン酸緩衝液中に懸濁し、この懸濁液に、同様に等張リン酸緩衝液に溶解したスーパー抗原を最終濃度が1mg/ml以上となるように添加し、室温で10分間攪拌する。また、スーパー抗原を吸着したリン酸カルシウム系化合物粒子は、凍結乾燥するか、又は等張リン酸緩衝液で洗浄した後、等張リン酸緩衝液に懸濁させて保存することができる。

【0011】こうして得られた本発明の免疫賦活剤は、必要に応じて、未吸着部位をブロッキング剤でブロックするのが好ましい。ブロッキング剤としては、リン酸カルシウム系化合物の未吸着部位に吸着されるものであって、その後の抗原-抗体反応に影響を与えないものであれば特に制限はないが、カゼイン、アルブミンなどの蛋白質が好適である。

【0012】

【実施例】次に、実施例に基づいて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって制限されるものではない。

【0013】実施例1

平均粒径10 μ mのハイドロキシアパタイトを充填したクロマトグラフィーカラム(直径7mm、長さ50mm)を濃度10mM、pH6.8のリン酸ナトリウム緩衝溶液(以下、NaPBと記す)で十分に置換した後、等張リン酸緩衝溶液(Dulbecco社製、以下、PBSと記す)に溶解した濃度1mg/mlのブドウ球菌腸管毒素B(以下、SEBと記す)を5マイクロリットル注入し、3分後からNaPB濃度を40mM/分の速度で上昇させた。この際の流速は2ml/分とし、カラムからの溶出物は、波長280nmの吸光度で観察し、溶離SEB濃度の経時変化を図1に示す。この条件で、ハイドロキシアパタイトに吸着したSEBは、NaPB濃度210mM程度でハイドロキシアパタイト表面から脱離した。図1から、SEBのハイドロキシアパタイトに対する親和性は高く、通常のPBSによる生理的条件下、SEBはハイドロキシアパタイト表面に強く保持されることが分かった。

【0014】実施例2

700℃で加熱処理した平均粒径10 μ mのハイドロキシアパタイト0.05gをPBS中で濃度1mg/mlのSEB100マイクロリットルと混合し、30分室温で攪拌した後、遠心分離し、上澄みを取り除き、SEB吸着ハイドロキシアパタイトを得た。さらに、このハイドロキシアパタイト沈殿をPBSで5回洗浄した後、沈殿に400mMのNaPB1mlを加え、遠心分離し、上澄みを回収した。回収した上澄みに蛋白質定量用の色素であるクマシーブリリアントブルーG250試薬(PIERCE社製)によりその蛋白質濃度を測定した。そ

の結果、700℃で熱処理した平均粒径10 μ mのハイドロキシアパタイトのSEB吸着容量は、ハイドロキシアパタイト1g当たり1.003mgであった。

【0015】実施例3

ハイドロキシアパタイト粒子として200℃で熱処理したものをを用いた以外は、実施例2と同様の実験を行ったところ、200℃で熱処理した平均粒径10 μ mのハイドロキシアパタイトのSEB吸着容量は、ハイドロキシアパタイト1g当たり1.863mgであった。実施例2及び3の結果から、200℃で熱処理したハイドロキシアパタイトの方がSEB吸着容量が大きいことが分かった。

【0016】実施例4

実施例2で製造したSEB吸着ハイドロキシアパタイトの未吸着部分をカゼインによってブロッキングした後、FITC標識抗SEBウサギIgG抗体を結合させた。こうして得た蛍光標識抗SEBウサギIgG抗体結合SEB吸着ハイドロキシアパタイト粒子を蛍光顕微鏡で観察すると、蛍光発光が認められた。また、得られた蛍光標識抗SEBウサギIgG抗体結合SEB吸着ハイドロキシアパタイト粒子に関してフローサイトメトリーによる分析を行なった。このフローサイトメトリーによる粒子数の測定結果を図2に示した。

【0017】比較例1

SEBを吸着させず、カゼインを吸着させたハイドロキシアパタイト粒子を用いた以外は、実施例4と同様の方法で実験を行い、蛍光顕微鏡で観察したところ蛍光発光は少なかった。また、フローサイトメトリーの結果を図3に示した。

【0018】実施例4と比較例1の結果を比較すると、図2(実施例4)では蛍光強度の強い側(右側)に粒子数のピークがあるため、抗SEB抗体を多く吸着していることが確認でき、図3では蛍光強度の強い側にピークがないことから、抗SEB抗体があまり吸着されなかったことが分かる。また、ハイドロキシアパタイトに吸着したSEBは、抗SEB抗体に対して抗原性を保持していることが分かった。

【0019】実施例5

この実施例では、SEBを吸着させたハイドロキシアパタイトによるマウスT細胞の増殖誘導を示す。10週齢のBALB/Cマウス(メス)の脾臓から赤血球を0.74%塩化アンモニウム、0.25%トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン溶液で溶解除去し、さらにB細胞を抗マウス免疫グロブリンヤギ抗体を固定化したシャーレで除去することによりT細胞を得た。培地は、RPMI-1640培地(GIBCO社製)に10%のウシ胎児血清を混合したものをを用いた。細胞濃度が 8×10^6 cells/mlの細胞懸濁液に実施例2で調製したSEB吸着ハイドロキシアパタイトを、濃度0.9mg/mlをはじめとして3.7 μ g/mlまで3倍ずつ6

段階に希釈して添加した。こうして調製した細胞懸濁液とSEB吸着ハイドロキシアパタイトとの混合物を組織培養用の平底マイクロプレート中で37℃で、5%炭酸ガス中で5日間培養した。培養後、培養液に3-(4,5-ジメチル-2-チアゾイル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロマイド(以下、MTTと記す)を添加して、細胞内ミトコンドリア中のデハイドロゲナーゼ酵素の活性を測定するMTT法により、T細胞の増殖活性を測定し、結果を図4に示す。図4に示した結果から、SEB吸着ハイドロキシアパタイトは、その濃度に応じてマウスT細胞を非常に強く増殖させたことが分かる。

【0020】実施例6

実施例4で調製した、SEB吸着後にカゼインで未吸着部をブロッキングしたハイドロキシアパタイトを用いた以外は、実施例5と同じ方法でマウスT細胞の培養実験を行い、T細胞の増殖活性を測定し、結果を図4に示す。図4に示した結果から、カゼインでブロッキングしたSEB吸着ハイドロキシアパタイトは、その濃度に応じてマウスT細胞を非常に強く増殖させたが、実施例5の結果と比較するとT細胞の増殖誘導は弱いことが分かる。

【0021】比較例2

比較例1で調製した、カゼインのみを吸着させたハイドロキシアパタイトを用いた以外は、実施例5と同じ方法でマウスT細胞の培養実験を行い、T細胞の増殖活性を測定し、結果を図4に示す。図4に示した結果から、カゼイン吸着ハイドロキシアパタイトでは、T細胞の増殖誘導は起こらないことが分かる。

【0022】比較例3

200℃で熱処理した平均粒径10 μ mのハイドロキシアパタイトを用いた以外は、実施例5と同じ方法でマウスT細胞の培養実験を行い、T細胞の増殖活性を測定し、結果を図4に示す。図4に示した結果から、T細胞の増殖誘導は起こらなかったことが分かる。

【0023】比較例4

増殖誘導剤として、PBSに溶解したSEBを最高濃度2 μ g/mlから8.2ng/mlの濃度まで順次3倍ずつ6段階に希釈して細胞懸濁液に添加した以外は、実施例5と同じ方法でマウスT細胞の培養実験を行い、T細胞の増殖活性を測定したところ、SEB濃度に応じてマウスT細胞の増殖が誘導されていた。

【0024】実施例7

実施例2で調製したSEB吸着ハイドロキシアパタイト1mg/mlを、T細胞濃度が1 $\times 10^6$ cells/mlの細胞懸濁液に添加し、実施例5と同じ培養条件で5日間培養を行った後、T細胞の増殖状態(以下、生物の形態と表現することがある)を顕微鏡により観察した。図5は培養したT細胞を100倍に拡大した顕微鏡写真を示す。この写真において、輪郭の黒い粒子はハイ

ドロキシアパタイトであり、輪郭の不明瞭な粒子はT細胞である。写真の中央には増殖によってクラスターを形成したT細胞が写っており、クラスターにハイドロキシアパタイト粒子が取り込まれている。したがって、SEB吸着ハイドロキシアパタイトは、T細胞と複合体を形成し、T細胞の増殖を誘導することが分かる。

【0025】比較例5

SEB吸着ハイドロキシアパタイトの代わりに、SEBを濃度2.2 μ g/mlで用いた以外は、実施例7と同じ方法でT細胞の培養を行った。図6に培養したT細胞を100倍に拡大した顕微鏡写真を示す。この場合にもT細胞は増殖し、クラスターを形成しているが、このクラスターはT細胞のみで形成されていることが分かる。

【0026】比較例6

SEB吸着ハイドロキシアパタイトの代わりに、未吸着のハイドロキシアパタイトを用いた以外は、実施例7と同じ方法でT細胞の培養を行った。図7に培養したT細胞を100倍に拡大した顕微鏡写真を示す。この写真において、輪郭の黒い粒子はハイドロキシアパタイトであり、輪郭の不明瞭な粒子はT細胞である。図7からハイドロキシアパタイト単独ではT細胞の増殖を誘導しないことが分かる。

【0027】実施例8

Ca/P比が1.0のリン酸カルシウムを用いた以外は、実施例1と同じ条件でSEBのリン酸カルシウムに対する吸着を測定したところ、図1と同様に210mMのNaPBによりリン酸カルシウム表面から溶離した。したがって、Ca/P比が1.0のリン酸カルシウムに対するSEBの親和性は高いことが示された。

【0028】実施例9

Ca/P比が2.0のリン酸カルシウムを用いた以外は、実施例1と同じ条件でSEBのリン酸カルシウムに対する吸着を測定したところ、図1と同様に210mMのNaPBによりリン酸カルシウム表面から溶離した。したがって、Ca/P比が2.0のリン酸カルシウムに対するSEBの親和性は高いことが示された。

【0029】実施例10

実施例8で製造したSEB吸着リン酸カルシウムを用いた以外は、実施例6と同じ条件でマウスT細胞に作用させたところ、実施例6と同様にT細胞の増殖が誘導された。

【0030】実施例11

実施例9で製造したSEB吸着リン酸カルシウムを用いた以外は、実施例6と同じ条件でマウスT細胞に作用させたところ、実施例6と同様にT細胞の増殖が誘導された。

【0031】

【発明の効果】本発明による免疫賦活剤は、ブドウ球菌腸管毒素をはじめとする各種のスーパー抗原を、その抗原性を損なうことなく保持しており、T細胞の増殖を強

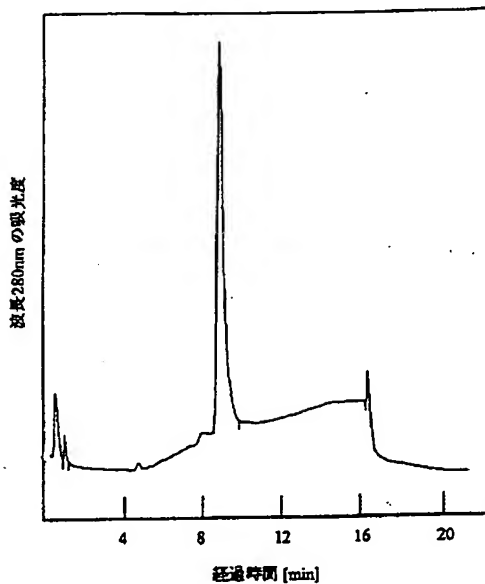
く誘導することができる。したがって、本発明による免疫賦活剤は、癌などの免疫療法への応用が期待でき、特に、病変部に効果的に免疫賦活剤を到達させるドラッグデリバリーシステムへ応用し、治療効果を高めることができる。

【図面の簡単な説明】

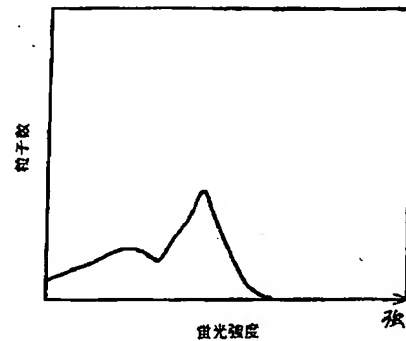
【図1】実施例1で調製したSEB吸着ハイドロキシアパタイトからのSEBのクロマトグラフィー分離曲線図である。

【図2】実施例4におけるフローサイトメトリー分析図である。

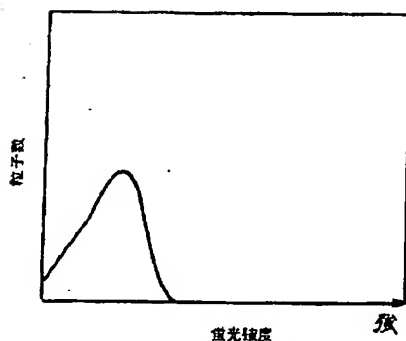
【図1】



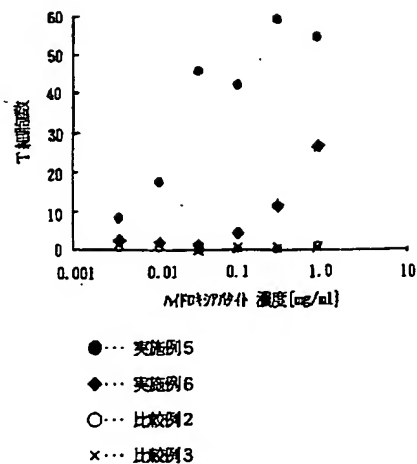
【図2】



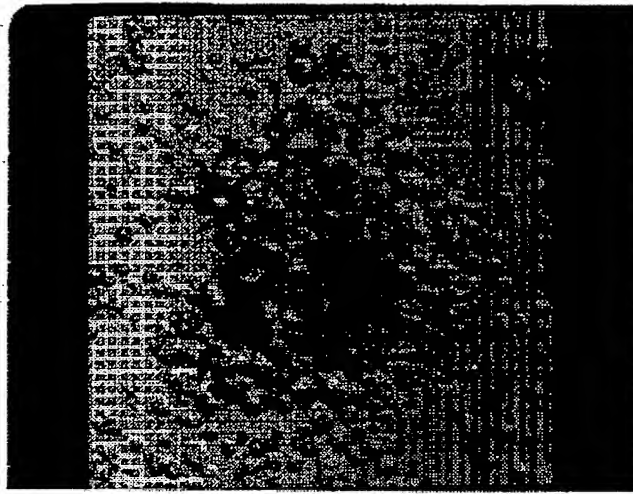
【図3】



【図4】

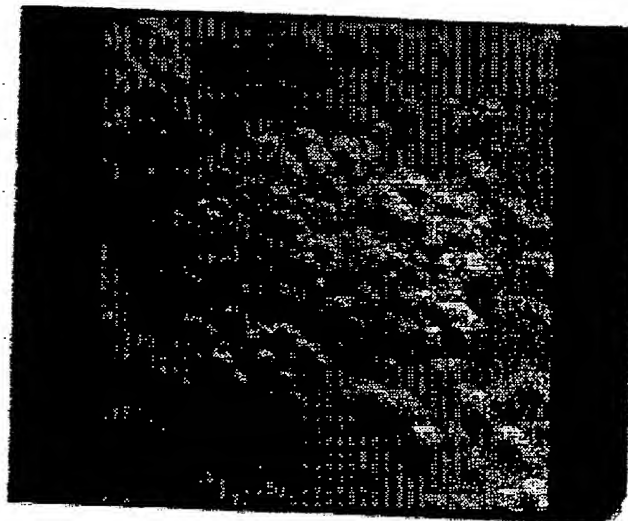


【図 5】



図面代用写真

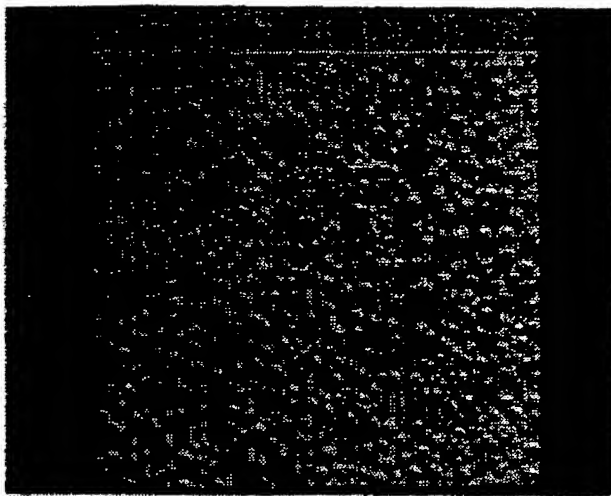
【図 6】



図面代用写真

BEST AVAILABLE COPY

【図7】



図面代用写真

【手続補正書】

【提出日】平成9年1月22日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正内容】

【図4】実施例5及び6並びに比較例2及び3における
 ハイドロキシアパタイト濃度とT細胞の増殖度との関係
 図である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図4

【補正方法】変更

【補正内容】

【図4】

